

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11)

Veröffentlichungsnummer: **0 350 690  
A2**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21)

Anmeldenummer: 89111538.8

(51)

Int. Cl. 4: **C07K 15/06 , A61K 39/395**

(22)

Anmeldetag: 24.06.89

(30)

Priorität: 14.07.88 DE 3823804

(43)

Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
17.01.90 Patentblatt 90/03

(84)

Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE ES FR GB IT LI NL SE

(71)

Anmelder: **BASF Aktiengesellschaft**  
**Carl-Bosch-Strasse 38**  
**D-6700 Ludwigshafen(DE)**

(72)

Erfinder: **Moeller, Achim, Dr.**  
**Wilhelm-Busch-Strasse 51**  
**D-6703 Limburgerhof(DE)**  
Erfinder: **Emling, Franz, Dr.**  
**Valentin-Bauer-Strasse 22**  
**D-6700 Ludwigshafen(DE)**  
Erfinder: **Kurfuerst, Manfred, Dr.**  
**Anilinstrasse 71**  
**D-6733 Hassoeh(DE)**  
Erfinder: **Meyer, Thomas, Dr.**  
**Gruenerstrasse 14 a**  
**D-6700 Ludwigshafen(DE)**

(54)

Neutralisation der In vitro- und In vivo-toxischen Eigenschaften von TNF-alfa durch monoklonale Antikörper und die davon abgeleiteten Fragmente.

(57)

Es werden Fragmente des monoklonalen Antikörpers MAK 195 beschrieben, die sich zur Bekämpfung von Krankheiten eignen.

EP 0 350 690 A2

chen zur Neutralisation der zytotoxischen Aktivität von TNF- $\alpha$  durch das F(ab)<sub>2</sub>- bzw. F(ab)-Fragment des monoklonalen Antikörpers mAK 195 wurde eine Konzentration an TNF gewählt, bei der mindestens 90 % der Zellen lysierten. Die Antikörperfragmente wurden in Medium auf eine Konzentration von 2  $\mu$ g/ml eingestellt und in eins zu zwei Schritten in Mikrotiterplatten verdünnt. Zu jeder Antikörperfragmentlösung (0,1 ml) wurden 0,05 ml rekombinanter TNF (2 ng/ml) gegeben und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte Zugabe von 50 000 L929-Zellen in 0,05 ml Medium und nach einer Inkubation von 20-24 h im Brutschrank bei 37 °C wurden die Zellen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt.

Der schützende Effekt der Antikörperfragmente zeigte sich durch die Färbbarkeit von intakten Zellen. Die Fragmente hemmen die zytotoxische Aktivität von TNF.

#### Beispiel 2

##### In vivo Neutralisation von human TNF- $\alpha$

Der schützende Effekt der F(ab)<sub>2</sub>- und F(ab)-Fragmente gegen human TNF wurde unter in-vivo-Bedingungen in männlichen Balb/c-Mäusen untersucht. 4-6 Wochen alte Mäuse wurden randomisiert und in Gruppen von 5 bzw. 10 Tieren aufgeteilt. Die Substanzen wurden intravenös in die laterale Schwanzvene gegeben (Applikationsvolumen 10 ml/kg). 24 h vor der rhu TNF- $\alpha$ -Applikation wurden die Tiere mit LPS 0,5 mg/kg i.v. "geprimed". TNF- $\alpha$  und LPS wurden vor der Injektion in Puffer A (150 mM NaCl und 0,18 % Rinderserumalbumin (Sigma, RIA-grade)), gelöst. Zur Messung der Neutralisierung wurde zuerst TNF gegeben, die mAK-Fragmente 15-30 min danach. Die Tötungsraten wurden nach 24 h bestimmt. In diesem Versuch zeigen die Fragmente eine starke Neutralisation von humanem TNF- $\alpha$ .

#### Beispiel 3

##### a) Herstellung von F(ab)<sub>2</sub>-Fragmenten

Der monoklonale Antikörper mAK 195 wurde bei pH 4,5 in Gegenwart von 0,5M NaCl mit Pepsin gespalten (30  $\mu$ g Pepsin/mg mAb; 90 min; 37 °C). Ausfallende Fc-Fragmente wurden abzentrifugiert und der Überstand über eine Sephacryl® S-200 Gelfiltrationssäule (1,5 cm x 75 cm) chromatographiert. Die F(ab)<sub>2</sub>-Fragmente enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und zur Entfernung von

Antikörperresten über Protein-A Sepharose® filtriert.

##### b) Herstellung von Fab-Fragmenten

Der monoklonale Antikörper mAK 195 wurde bei pH 8,0 in Gegenwart von 0,5M NaCl mit Cystin-aktiviertem Papain (10  $\mu$ g/mg mAb; 4 h; 37 °C) gespalten. Anschließend wurde das Papain durch Zugabe von 20 mM Jodacetamid inaktiviert und das Gemisch über eine Sephacryl® S-200 Gelfiltrationssäule (1,5 cm x 75 cm) getrennt. Die Fab-Fragmente enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und zur Entfernung der Fc-Fragmente über Protein A Sepharose® filtriert.

Die Bezeichnungen "Sephacryl" und "Sepharose" sind Warenzeichen der Firma Pharmacia.

#### Ansprüche

1. F(ab)<sub>2</sub>- und/oder F(ab)-Fragmente des monoklonalen Antikörpers mAK 195.

2. F(ab)<sub>2</sub>- und/oder F(ab)-Fragmente des monoklonalen Antikörpers mAK 195 zur Verwendung bei der Bekämpfung von Krankheiten.

-1- \* -

C12P21/08F

⑪ Veröffentlichungsnummer: **0 350 690  
A3**

⑫

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑪ Anmeldenummer: 89111538.8

⑤ Int. Cl. 5: C07K 15/06, A61K 39/395

⑫ Anmeldetag: 24.06.89

⑬ Priorität: 14.07.88 DE 3823804

⑭ Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
17.01.90 Patentblatt 90/03

⑮ Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE ES FR GB IT LI NL SE

⑯ Veröffentlichungstag des später veröffentlichten  
Recherchenberichts: 04.07.90 Patentblatt 90/27

⑰ Anmelder: BASF Aktiengesellschaft  
Carl-Bosch-Strasse 38  
D-6700 Ludwigshafen(DE)

⑱ Erfinder: Moeller, Achim, Dr.  
Wilhelm-Busch-Strasse 51  
D-6703 Limburgerhof(DE)  
Erfinder: Emiling, Franz, Dr.  
Valentin-Bauer-Strasse 22  
D-6700 Ludwigshafen(DE)  
Erfinder: Kurfuerst, Manfred, Dr.  
Anillinstrasse 71  
D-6733 Hassoeh(DE)  
Erfinder: Meyer, Thomas, Dr.  
Gruenerstrasse 14 a  
D-6700 Ludwigshafen(DE)

② Neutralisation der in vitro- und in vivo-toxischen Eigenschaften von TNF-alfa durch monoklonale Antikörper und die davon abgeleiteten Fragmente.

③ Es werden Fragmente des monoklonalen Antikörpers MAK 195 beschrieben, die sich zur Bekämpfung von Krankheiten eignen.

EP 0 350 690 A3



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 89 11 1538

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
D, Y	EP-A-0 260 610 (BASF A.G.) * Ansprüche 4,7,12; Seite 3, Zeilen 6-7,37-43; Beispiel 3 * ---	1,2	C 07 K 15/06 A 61 K 39/395
D, Y	NATURE, Band 330, 17. Dezember 1987, Seiten 662-664, London, GB; K.J. TRACEY et al.: "Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia" * Seite 662, rechte Spalte, Zeilen 4-13 * ---	1,2	
E	EP-A-0 355 067 (CELLTECH LTD) * Ansprüche 1-3; Spalte 2, Zeilen 22-46 * -----	1,2	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)
			A 61 K C 12 P
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 10-04-1990	Prüfer RYCKEBOSCH A.O.A.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			
T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument ..... & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			